

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E. A. P. DE MEDICINA VETERINARIA

**Identificación de *Salmonella* spp. en tortugas motelo
(*Geochelone denticulata*) de un criadero de la ciudad
de Iquitos, región Loreto**

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR

Nelson Manuel Ruiz Moreno

Lima – Perú

2009

DEDICATORIA

Para las personas que más amo en el mundo:
Mis padres Segundo Manuel y Alejandrina, mis hermanos Doris y Edgar, mi sobrina Giovanna y a los dos seres más incondicionales que aparecieron en mi vida por brindarme su amor y alegría: mi esposa Maria Aurelia y mi hijo Haziell Iosef.

AGRADECIMIENTO

A las personas que forman el equipo de trabajo del Laboratorio de Microbiología de la Facultad , por su invaluable colaboración.

A la Dra. Sonia Calle, por su dedicada asesoría, exigencia y cariño.

Al Dr. Hugo Galvez, por su generosa ayuda ,paciencia y amistad

Al Dr. Nestor Falcón, por su colaboración y paciencia.

A los Drs. Miguel y Chris, por su colaboración y amistad.

Y a todas las personas que me brindaron su apoyo en especial a ese gran amigo Ruben Villackaki que tuvo la gentileza de ayudarme así como también a Mario S, Daniel M, Henry G. y todos aquellos; que han tenido la buena voluntad de apoyarme en la realización de la presente Tesis.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	ii
Summary.....	iii
Lista de cuadros.....	iv
Lista de figuras.....	v
Lista de apéndice.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Agente causal.....	4
2.1.1. Características microbiológicas.....	4
2.1.2. Clasificación.....	4
2.1.3. Clasificación de especie.....	5
2.1.4. Clasificación serológica de Kauffmann-White.....	8
2.1.5. Clasificación en biotipos y fagotipos.....	8
2.2. Nomenclatura.....	9
2.2.1. Morfología de colonia.....	12
2.2.2. Necesidades nutricionales.....	12
2.2.3. Determinantes de patogenicidad.....	13
2.2.3.1. Antígenos.....	13
2.2.3.2. Toxinas.....	15
2.3. Tipificación.....	16
2.4. Epidemiología.....	17
2.5. Patogénesis.....	20
2.5.1. Mecanismos de adherencia.....	21
2.5.2. Mecanismo de infección.....	24

2.6. Inmunidad.....	26
2.7. Signos clínicos.....	28
2.8. Diagnóstico y aislamiento.....	29
2.8.1. Diagnóstico bacteriológico y serológico.....	29
2.8.1.1. Métodos de aislamiento.....	29
2.8.1.2. Pruebas serológicas.....	32
2.9. Prevención y control.....	33
2.10. Salud pública.....	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
3.1. Lugar de estudio.....	35
3.2. Animales.....	35
3.3. Tamaño de muestra.....	36
3.4. Muestra.....	36
3.5. Procesamiento de las muestras.....	38
3.5.1. Procedimiento.....	39
IV. RESULTADOS.....	43
V. DISCUSIÓN.....	46
VI. CONCLUSIONES.....	50
VII. APÉNDICE.....	51
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	53

LISTA DE CUADROS

- CUADRO 1.** Género *Salmonella*. Característica Diferenciales de los Subgéneros.....Pag. 5
- CUADRO 2.** Género *Salmonella*. Identificación Bioquímica de las especies (Edwars y Swing).....Pag.6
- CUADRO 3.** Género *Salmonella*. Correspondencia entre las Clasificaciones de Kauffmann y de Le Minor..... Pag.7
- CUADRO 4.** Género *Salmonella* especies y sub-especies.....Pag.10
- CUADRO 5.** Fimbrias que se han reportado en *Salmonella*.....Pag.22
- CUADRO 6.** Descripción de Características Metabólicas de especies de *Salmonella spp*.....Pag.40
- CUADRO 7.** Proporción de muestras positivas y porcentajes a las especies de bacterias en el total de de la población diagnosticadas mediante pruebas bioquímicas.....Pag.44
- CUADRO 8.** Tipificación de muestras positivas a *Salmonella spp* realizada en el Instituto Nacional de Salud.....Pag.45

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1:** Tortugas Motelos (*Geochelone denticulata*) animales que se trabajaron en el estudio.....Pag.36
- Fig. 2:** Recolección de muestras de tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) mediante hisopado rectal y colocación en el medio de transporte T.S.IPag.37
- Fig. 3:** Muestras de hisopados rectales de tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) en medio T.S.I.Pag.38
- Fig. 4:** Colonia compatible a *Salmonella spp* en agar XLD.....Pag.41
- Fig. 5:** Colonias compatibles a *Salmonella spp* en agar SS y XLD.....Pag.41
- Fig. 6:** Observación de las características metabólicas mediante pruebas bioquímicas de la bacteria *Salmonella spp.*Pag.42
- Fig.7:** Prueba serológica (aglutinación simple con antisuero Polivalente DIFCO *Salmonella H Antiserum a-z*).....Pag.42

LISTA DE APÉNDICE

ANEXO. 1: Control de calidad y tipificación: <i>Salmonella</i> Typhimurium Instituto Nacional de Salud.....	Pag.52
---	--------

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue detectar la presencia de *Salmonella spp.* en el total (n=30) de la población de tortugas motelo (*Geochelone denticulata*) de un criadero de 25 m² de área, construido con materiales de la misma zona y piso de tierra; la alimentación de los animales a base de frutas y verduras, agua *Ad libitum* y se observó presencia de roedores, la crianza se realizó en condiciones de cautiverio en la ciudad de Iquitos, Región Loreto. Las muestras de heces se obtuvieron por hisopado rectal, luego llevadas al laboratorio de la Estación Experimental IVITA-Iquitos y se colocaron en un medio de enriquecimiento Agar Soya Trypticase para luego ser remitidas en condiciones de refrigeración a la Sección de Bacteriología y Micología del Laboratorio de Microbiología y Parasitología, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; para su aislamiento e identificación mediante pruebas de cultivo bacteriológico y bioquímicas. El 6.7% (2/30) de las muestras fueron positivas a *Salmonella spp.* Adicionalmente se encontraron otras bacterias como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en un 80% (24/30), *Proteus vulgaris* en un 26.6% (8/30), *Proteus mirabilis* en 6.7% (2/30) y *Citrobacter spp.* 16.7% (5/30). La *Salmonella spp.* se detectó en tortugas sanas y enfermas, además se realizó la tipificación por el método *Who Global Salm Surv*, obteniendo como resultado *Salmonella enterica subespecie enterica serotipo typhimurium* en las dos muestras positivas a dicha bacteria. Se concluye que existe presencia de *Salmonella spp.* (*Salmonella typhimurium*) en muestras de hisopados cloacales de tortugas motelo criadas en cautiverio, y que los demás microorganismos hallados forman parte de la familia enterobacteriaceae propio del tracto intestinal de éstos animales.

Palabras claves: *Salmonella*, tortugas motelo, enterobacterias

SUMMARY

The objective of the present study was to detect the presence of *Salmonella* spp. in the total (n=30) of the population of turtles motelo (*Geochelone denticulata*) of a hatchery of 25 m² of area, built with materials of the same area and earth floor; the feeding of the animals with the help of fruits and vegetables, dilutes Ad libitum and presence of rodents, the upbringing one was observed I carry out under captivity conditions in the city of Iquitos, Región Loreto. The samples of grounds were obtained by rectal hisopado and then taken to the laboratory of the Experimental Station IVITA-Iquitos and they were placed in a means of enrichment Agar Soya Trypticase for then to be remitted under refrigeration conditions to the Section of Bacteriology and Micología of the Laboratory of Microbiology and Parasitología, of the Faculty of Veterinary Medicine of the University National Major of than San Marcos; for their isolation and identification by means of bacteriological and biochemical cultivation tests. The 6. 7% (2/30) of the samples they went positive to *Salmonella* spp. Additionally they were other bacterias like *Escherichia coli* and *Pseudomona aeruginosa* in 80% (24/30), *Proteus vulgaris* in a 26. 6% (8/30), *Proteus mirabilis* in 6. 7% (2/30) and *Citrobacter* spp. 16. 7% (5/30). The *Salmonella* spp was detected in healthy and sick turtles, she was also carried out the tipificación for the method Who Global Salm Surv, obtaining *Salmonella enterica subspecies enterica serotipo typhimurium* in the two positive samples to this bacteria. You concludes that presence of *Salmonella* spp exists. (*Salmonella typhimurium*) in samples of hisopados cloacales of turtles motelo raised in captivity, and that the other found microorganisms are part of the family enterobacteriaceae characteristic of the intestinal tract of these animals.

Key words: *Salmonella*, turtles motelo, enterobacterias

I. INTRODUCCIÓN

Las salmonellas causantes de enfermedades infecciosas consideradas como enfermedad endémica continúa siendo un problema en medicina veterinaria y humana, por ocasionar grandes pérdidas económicas convirtiéndose así en un importante problema de salud animal y pública (Wray, 1993). Por lo tanto, es claro que la salmonelosis es una zoonosis de gran importancia en salud pública porque representa una de las enfermedades con mayor demanda de atención hospitalaria en muchos países (Sanchez *et al.*, 2002). Todas las especies de salmonellas, representan un riesgo ocupacional, llegando a afectar a veterinarios e incluso a sus familias. Actualmente, múltiples infecciones de salmonella como la enterocolitis y la infección septicémica resistentes a drogas son reportadas en veterinarios expuestos a este microorganismo (Bradley *et al.*, 2001).

La bacteria puede ser transmitida por contacto directo e indirecto a animales susceptibles, demostrando así la fuerza de patogenicidad y buena resistencia que presenta la salmonella tanto en el individuo como en el medio ambiente (Corrente *et al.*, 2004).

La *Salmonella spp.* afecta a diversas especies, no siendo específica de ninguna de ellas pudiendo causar problemas gastrointestinales. Un gran número de especies, incluyendo animales salvajes criados en zoológicos o laboratorios, han sido investigados como potenciales reservorios

de salmonella (Monzón *et al.*, 1995). Estos animales que actúan como reservorio, juegan un importante rol en la determinación total del modelo epidemiológico de la infección por este agente (Geue y Loschner, 2002).

Muchas especies de salmonella se encuentran en el tracto intestinal, tanto de vertebrados de sangre caliente como de sangre fría como parte normal de su flora intestinal (Geue y Loschner, 2002, Corrente *et al.*, 2004) siendo considerados los reservorios para todas las especies y subespecies de salmonella (Bauwens *et al.*, 2006). Por otro lado sólo un limitado número de serotipos se han adaptado a animales homeotérmicos capaces de invadir la mucosa intestinal y causar gastroenteritis, dependiendo de la especie y serotipo de la salmonella involucrada, edad y estado inmunológico del hospedero. La salmonella en animales poiquilotérmicos como tortugas está generalmente limitado a la colonización del tracto intestinal sin invasión del tejido (Pasmans *et al.*, 2003).

La proporción de reptiles portadores es amplio, aunque algunos grupos muestran una mayor susceptibilidad y podrían desarrollar la infección por salmonella, éstos animales puede constituir no sólo un serio problema de salud animal, sino ser la principal fuente de contaminación y que podrían causar infección en los humanos que viven en sus proximidades (Briones *et al.*, 2004; Monzón *et al.*, 1995).

La presencia de salmonella en los órganos internos de reptiles que muestran signos clínicos esta generalmente asociado con factores predisponentes, tales como: estados de estrés, carga parasitaria, traumas, tumores, enfermedades infecciosas, etc. (Pasmans *et al.*, 2003). Los serovares de *Salmonella enterica* muestran una adaptación a los reptiles, mostrándose como portadores, y conservando su patogenicidad para animales de sangre caliente; Pero también existe como ejemplo, algunas propiedades de cepas invasivas de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* aisladas de cocodrilos

siendo aislados de modelos experimentales en ratones (Corrente *et al.*, 2004; Pasmans *et al.*, 2000).

Salmonella está en la flora normal del intestino de tortugas, pero han sido descritas en muchas ocasiones, como portador, sin mostrar algún signo clínico, pudiendo representar una importante fuente de infección zoonótica a los seres humanos (Pasmans *et al.*, 2002).

La incidencia de salmonella en tortugas ha sido el tema de extensas investigaciones, ya que, éstos animales son comúnmente usados como mascotas (Strohl *et al.*, 2004); siendo frecuentemente reportadas como responsables de problemas de salmonelosis en humanos, especialmente en niños; sin embargo, aun faltan investigaciones sobre el rol que juegan los reptiles de vida libre así como en cautiverio (Hidalgo-Vila *et al.*, 2007).

En los últimos años los zoocriaderos vienen criando a la tortuga motelo (*Geochelone denticulata*) presentando diversos problemas de sanidad, ésta especie de reptil se encuentra distribuida en la selva peruana, y como cualquier otra especie animal, cuando es sometida a condiciones de cautiverio tienden a experimentar diversas situaciones de estrés (Silvino, 1996). Además esta enterobacteria podría causar infección y ser una de las causas de mortalidad de las tortugas motelo criadas en cautiverio, situación que debería ser considerada por las personas dedicadas a la fauna silvestre y los que tienen contacto con éstos animales, sobretudo cuando son criados como mascotas. Por lo que es necesario detectar *Salmonella spp* en tortugas motelo criadas en cautiverio, no sólo como reservorio en estos animales si no como una posible causa de infección si se presentan favorablemente las condiciones. También es necesario realizar la identificación del serotipo de las cepas de éste microorganismo por su implica en salud pública.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. AGENTE CAUSAL

2.1.1. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.

El género salmonella se incluye en la familia enterobacteriaceae, integrada por bacilos gram negativos anaerobios facultativos. Poseen, por lo tanto, las características generales de las enterobacterias: son fermentadores de la glucosa, catalasa positivo, oxidasa negativo y suelen ser móviles; a excepción de *Salmonella gallinarum*, que es inmóvil (Freeman, 1989).

2. 1. 2. CLASIFICACIÓN

El género salmonella se clasifica de acuerdo a sus propiedades bioquímicas en subgéneros según (Le Minor *et al.*, 1982) o en especies (Edwards y Puente, 1998; Ewing, 1986). Existiendo una nueva clasificación en sub especies basada en la consideración conjunta de propiedades bioquímicas y genómicas (Le Minor y Poppof, 1987). En todos los casos, los subgéneros, especies o sub-especies se pueden dividir, a su vez, en serotipos o serovares, según el esquema de Kauffmann-White (Le Minor *et al.*, 1982).

2. 1. 3. CLASIFICACION DE ESPECIE

a) De acuerdo a su característica bioquímica

Kauffmann (Le Minor *et al.*, 1982) divide el género salmonella en 4 subgéneros. Esta clasificación ha sido adoptada en el manual de (Galán, 1996) añadiendo un nuevo subgénero (Cuadro 1) en el subgénero I se encuentran las salmonella de los animales de sangre caliente que incluyen la mayoría de serotipos patógenos y en los subgeneros II, III, (*Salmonella arizonae*) IV, y V, las aisladas de los animales de sangre fría y del medio ambiente.

CUADRO 1 Género <i>Salmonella</i> . Característica Diferenciales de los Subgéneros					
Subgéneros					
	nvo. Subgénero				
	I	II	III	IV	V
β Galactosidasa	-	-,X	+	-	-
Producción de Acido					
Lactosa	-	-	+,X	-	-
Dulcitol	+	+	-	-	-
Mucato	+	+	d	-	-
Galactorunato	-	+	d	+	+
Utilización del					
Malonato	-	+	+	-	-
d-Tartrato	+	-,X	-,X	-,X	-
Hidrólisis de Gelatina	-	+	+	+	-
Crecimiento en CNK	-	-	-	+	+
Habitad					
Animales de sangre caliente	+	-	-	-	-
Animales de sangre fría y medio ambiente	-	+	+	+	+

Fuente: Briones *et al.* , 2004

b) Clasificación de Edwards y Ewing.

Por características bioquímicas diferencia tres especies *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae suis* y *Salmonella enteritidis*, (Cuadro 2), que se subdivide por métodos serológicos (antígenos O y H) y bioquímicos en serotipos y bioserotipos. Las dos primeras especies contiene un solo serotipo, mientras que *Salmonella enteritidis* comprende los serotipos restantes, que deben designarse como *Salmonella enteritidis* serotipo *typhimurium*, *Salmonella enteritidis* serotipo *paratyphi* B, etc. A diferencia de la clasificación anterior, considera *Salmonella arizonae* como un género aparte con la especie *Salmonella hinshawii*.

CUADRO 2. Género <i>Salmonella</i> . Identificación Bioquímica de las Especies (Edwards y Swing)			
	<i>S. typhi</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. enteritidis</i>
SH 2	+,debil	+	+
Citrato de Simmons	-	(+)	+
Ornitin – Descarboxilasas	-	+	+
Gas de la Glucosa	-	+	+
Dulcitol	-	-	+
Trehalosa	+	-	+
Arabinosa	-	-	+
Ramnosa	-	+	+

Fuente: Briones *et al.* , 2004

c) Clasificación de Le Minor

Sobre la base del estudio de gran número de caracteres fenotípicos y genotípicos (hibridación de ADN/ADN) y aplicación de los datos de la taxonomía numérica al análisis de los resultados, (Le Minor y Popoff, 1987) considera que el género *salmonella* está constituido por una sola especie, que puede dividirse en 6 sub especies que se corresponden en líneas generales con los subgéneros de Kauffmann (Le Minor *et al.*, 1982). (Cuadro 3)

CUADRO 3. Género <i>Salmonella</i>. Correspondencia entre las Clasificaciones de Kauffmann y de Le Minor	
Clasificación de Kauffmann modificada Bergey. 1984	Clasificación de Le Minor Veron y Popof (1982)
<p>Género <i>Salmonella</i> Subgéneros</p> <p>- -</p> <p>I <i>Salmonella choleraesuis</i> II <i>Salmonella salamae</i> III <i>Salmonella arizonae</i></p> <p>IV <i>Salmonella houtenae</i> V <i>Salmonella bongor</i></p>	<p>Género <i>Salmonella</i> Especie: <i>Salmonella choleraesuis</i> Subespecies</p> <p>I <i>Salmonella choleraesuis</i> II <i>Salmonella salamae</i> III <i>Salmonella arizonae</i> (Serovars Monofasico) IV <i>Salmonella arizonae</i> (Serovars Difasico) V <i>Salmonella houtenae</i> VI <i>Salmonella bongor</i></p>

Fuente: Briones *et al.* , 2004

2. 1. 4. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA (SEROTIPOS) DE KAUFFMANN-WHITE

La clasificación serológica en serotipos o serovares en el esquema de Kauffmann- White (Le Minor *et al.*, 1982) se efectúa sobre la base de la determinación de los antígenos O y H (Cuadro 4) atendiendo al antígeno O las salmonellas se han dividido en 67 grupos O, que se designan primeros por letras de la A a la Z y luego por números del 31 al 67, y dentro de cada grupo O se dividen serotipos por sus antígenos flagelares en fase 1 ó 2; los primeros se designan por letras minúsculas y los segundos por números. En la actualidad se conocen 2200 serotipos (Briones *et al.*, 2004).

2. 1. 5. CLASIFICACIÓN EN BIOTIPOS Y FAGOTIPOS

Sometiendo los serotipos a diversas pruebas bioquímicas que incluyen la fermentación de azúcares, alcoholes, glicerina y ácidos orgánicos, pueden confirmarse los resultados del análisis antigénico y aun en algunos casos, subdividirse los serotipos en tipos bioquímicos, biotipos o biovars (Briones *et al.*, 2004).

Por otra parte, algunos serotipos (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*) pueden subdividirse atendiendo al comportamiento de cada cepa frente a un grupo de bacteriófagos, fagotipos, o fagovars (Briones *et al.*, 2004).

Esta técnica es de gran importancia en epidemiología, porque permite:

- a. Conocer si un conjunto de casos que aparecen en una región constituyen un solo foco o varios, según si las especies aisladas pertenezcan o no al mismo fagotipo.
- b. Seguir la cadena de infección en sentido retrogrado hasta el origen de la fuente de infección y en consecuencia, detectar los portadores crónicos, que son la causa del mantenimiento de la endemia y punto de partida de brotes epidémicos

- c. Determinar el mapa fagotípico a fin de poder conocer si un brote es propio de una región. El tipo E1 es el más frecuente en la mayoría de países.

2. 2. NOMENCLATURA

La nomenclatura de salmonella es compleja. Se han usado diferentes sistemas para referir a este género. Teniendo en cuenta que estas bacterias tienen una importante homología general de ADN, debiendo ser caracterizadas como una especie única (Le Minor y Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989). Teniendo en cuenta la necesidad de uniformizar criterios entre biólogos, médicos, veterinarios, etc. la mayoría ha optado por seguir la propuesta de Kaufmann (Le Minor y Popoff, 1987) con las recientes modificaciones (formuladas desde el Centro de Referencia de la O.M.S, en el Instituto Pasteur), pero manteniéndose aun en debate; dividiéndose el género en dos especies: *Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*, (Cuadro 4) diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del ortonitrofenil-B-D-galactopiranosido (ONPG), el crecimiento en presencia de KCN y otras (Brenner *et al.*, 2000).

En un principio, se utilizaron nombres representativos, por ejemplo, de acuerdo al origen geográfico donde el serotipo fue aislado por primera vez (*Salmonella montevideo*), o el del proceso infeccioso donde se aisló (*Salmonella abortusovis*). Esta tradición ha quedado restringida a aquellas cepas pertenecientes a la subespecie enterica. Cuando se trata de aislamientos correspondientes a las demás subespecies, al igual que para *Salmonella bongori*, se les designa por su fórmula antigénica determinada por los antígenos somáticos, flagelares y capsulares. (Brenner *et al.*, 2000).

En el Manual de Bergey's de Bacteriología Determinativa (Bergey *et al.*, 1987) la nomenclatura recomendada consiste en denominar una cepa con fórmula antigénica. Sin embargo, dado que la controversia aún no ha sido resuelta, es aceptable desde el punto de vista científico emplear una

nomenclatura simplificada, por ejemplo, *Salmonella enteritidis*; así, esta denominación es utilizada en muchas publicaciones y en los informes clínicos de los laboratorios de Microbiología médica (Brenner *et al.*, 2000) .

Salmonella enterica subespecie *enterica* agrupa a la mayoría de las bacterias de este género que se asocian con animales de sangre caliente y con el hombre, mientras que las demás subespecies incluida *Salmonella bongori* son habitantes del medio ambiente y se asocian con animales de sangre fría. *Salmonella enterica* se subdivide, en seis subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houenae*(IV), e *indica* (VI) que corresponden a los antiguos subgéneros. Estas subespecies son diferenciables bioquímicamente (Brenner *et al.* , 2000; Popoff y Le Minor, 2001).

CUADRO 4. Género *Salmonella* especies y sub-especies

Nombre taxonómico	Cepa
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 13312
<i>Salmonella choleraesuis subsp. choleraesuis</i>	ATCC 13312
<i>Salmonella choleraesuis subsp. salamae</i>	CIP 8229
<i>Salmonella choleraesuis subsp. arizonae</i>	ATCC 13314
<i>Salmonella choleraesuis subsp. diarizonae</i>	CIP 8231
<i>Salmonella choleraesuis subsp. houtenae</i>	CIP 8232
<i>Salmonella choleraesuis subsp.indica</i>	CIP 102501
<i>Salmonella enteritidis</i>	TCC 13076
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 19430
<i>Salmonella bongori</i>	CIP 8233

Fuente: Takayuki *et al.*, 2000

Históricamente el nombre de la especie del serovar se dio bajo el criterio de la práctica médica. Algunos serovares denotaban síndrome (*Salmonella typhi*) o relación (*Salmonella paratyphi* A, B, C). Otros nombres surgieron de la correlación síndrome hospedero específico, lo cual fue correcto en algunos casos (*Salmonella abortus- ovis*, *Salmonella abortus –equi*) y equivocado en otros (*Salmonella typhi-murium*, *Salmonella cholerae–suis*). Para evitar confusión posteriormente se usaron los nombres indicando el lugar de aislamiento de la primera cepa del serovar (*Salmonella london*, *Salmonella panama*, *Salmonella tel-el-kebir*). (Briones *et al.*, 2004).

En el congreso Internacional de Microbiología realizado en Moscú en 1968 se acordó que los nombres compuestos sean condensados en nombres simples (*Salmonella typhimurium*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella tel-elkebir*). Estos nombres incorrectamente considerados como nombres de especies, fueron por esta razón italicizados. Estos en realidad no poseían un criterio taxonómico, y eran usados para nombrar bacterias frecuentemente aisladas en humanos o en medicina veterinaria. En otras especies bacterianas (*Escherichia coli*. por ejemplo) no se han dado nombres a los serovares como en el caso de salmonella (Brenner *et al.*, 2000).

Los nombres son mantenidos sólo para los serovares de las subespecies enterica los cuales suman más de 99.5 % de los aislamientos de cepas de salmonella. Estos nombres no deben ser italicizados y la primera letra debe ser una mayúscula. A fin de enfatizar que los serotipos no corresponden a especies o subespecies distintas no se los escribe con letra itálica y sus nombres comienzan con mayúscula (Brenner *et al.*, 2000).

En la práctica clínica no es necesario indicar el nombre de las subespecies, pero si el nombre del serovar de la subespecie *enterica enteritidis*, *typhimurium*, *london* y *montevideo* son ejemplos de serovares de la subespecie *enterica*. Las denominaciones *Salmonella serotipo enteritidis* o *Salmonella enteritidis* aun son usados en la práctica diaria. Los serovares de otras subespecies de *Salmonella*

enterica y aquellos para *Salmonella bongori* se designan solo por su fórmula antigénica (Popoff, 2001).

La mayoría de las bacterias incluidas en la subespecie *enterica* presentan un conjunto de características metabólicas comunes. Fermentan glucosa con producción de gas y también manitol, sorbitol y otros carbohidratos, pero no lactosa ni sacarosa. Utilizan habitualmente citrato como única fuente de carbono pero no malonato, lo que las diferencia de otras subespecies como *Salmonella arizonae*. Su fermentación es de tipo ácido mixta, con reacción negativa de Voges-Proskauer. Son en general productoras de ácido sulfhídrico, y son ureasa y fenilalanina desaminasa negativas; descarboxilan ornitina y lisina. Son capaces de sobrevivir durante muchos años en substratos simples manteniéndolas en lugar oscuro a temperatura ambiente, y en recipiente cerrado. Dentro de la misma subespecie existen diferencias bioquímicas, por ejemplo, *Salmonella typhi* que no utiliza citrato ni descarboxila ornitina y es débil productor de ácido sulfhídrico (Ewing, 1986).

2. 2. 1. MORFOLOGÍA DE COLONIA.

De la salmonella estudiada, la mayoría poseen fimbrias adhesivas, normalmente de tipo manosa positiva. Estos microorganismos al igual que otras bacterias, varía de acuerdo a la forma de la colonia de aspecto liso o rugoso. La mutación de lisa a rugosa se manifiesta, no solo como una alteración de la morfología de la colonia, sino también como una pérdida de virulencia (Freeman, 1989).

2. 2. 2. NECESIDADES NUTRICIONALES

Las bacterias de éste grupo tienen requerimientos nutricionales no exigentes, y se desarrollan con facilidad en los medios nutricionales habituales. Rara vez fermentan glucosa y sacarosa formando acidez, algunas veces se observa gas a partir de glucosa y manosa; y habitualmente producen H₂S (Brooks *et al.* ,1999). Se obtiene un crecimiento adecuado en medios sintéticos

que contienen sales de amonio como fuente de nitrógeno y fuentes de carbono, como glucosa, piruvato o lactato. La temperatura óptima de desarrollo es de 37° C, aunque puede observarse un buen crecimiento a temperatura ambiente. Son anaerobios facultativos porque crecen tanto en condiciones aerobias como en condiciones anaerobias (Freeman, 1989).

2. 2. 3. DETERMINANTES DE PATOGENICIDAD

Se encuentran relacionados con antígenos estructurales y toxinas: antígeno O también llamado somático del lipopolisacarido en la pared celular y es la base de la clasificación en subgrupos, el antígeno H o flagelar de la proteína flagelina, es la base de la clasificación de especies, así como el antígeno Vi componente de la cápsula o envoltura de la bacteria y que un grupo reducido de especies o serotipos lo presentan. En el caso de reptiles, para la determinación de la patogenicidad intervienen diversos factores, debido que los casos clínicos en éstos animales son muy poco reportados. Si existiera el caso de una posible infección podría estar determinada por: el serotipo involucrado, la edad de las tortugas, la dosis infectiva, el estado inmunológico y otras condiciones predisponentes (Infante *et al.*, 2002).

2. 2. 3. 1. Antígenos.

Las salmonellas pueden presentar fimbrias de tipo 1, probablemente asociadas con su capacidad de adherencia en las células epiteliales del intestino delgado, y antígenos O y Vi, relacionados con la virulencia que les permite sobrevivir en el interior de los fagocitos responsables de su capacidad de penetración e invasión (Infante *et al.*, 2002).

El género salmonella posee tres tipos de antígenos: somático (O), flagelar (H) y un reducido grupo de serotipos pueden presentar al antígeno capsular o de envoltura (Vi) (Infante *et al.*, 2002).

a) Antígeno O

La naturaleza de los antígenos somáticos O es la de ser un lipopolisacárido asociados a la pared celular y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína – lipopolisacárido. La fracción interna se encuentra asociada con la endotóxina (lípidos A) y la fracción externa o terminal, responsable de la especificidad serológica (Poppof, 2001).

Por tratamiento de las suspensiones vivas por el calor se destruye el antígeno H y Vi, obteniéndose suspensiones puras de O, que en presencia del anticuerpo específico producen una aglutinación lenta y granular, que no se deshace por agitación (aglutinación somática). Por lo general, el antígeno O no es único, sino que está constituido por diversos factores antigénicos, algunos de los cuales pueden ser comunes con otros serotipos y permiten dividir las salmonella en grupos O (Poppof, 2001).

Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico. Así, el factor antigénico O:4 caracteriza el antiguo grupo B, hoy llamado O: 4, mientras que los antígenos menores tienen menor valor discriminativo. Pueden encontrarse otros antígenos menores generados por modificaciones químicas o por conversiones en la replicación. Por ejemplo, el antígeno O: 12 lo presenta toda salmonella perteneciente a los grupos A, B y D. Ahora es más lógico denominar a cada grupo O usando el factor característico O. Se prevé que en el futuro se prescindirá del uso de letras para designar a los primeros grupos O (Poppof, 2001).

b) Antígeno H

Es un antígeno termolábil, de naturaleza proteica, contenido en los flagelos. Se inactiva por el calor, alcohol, y ácidos; por el contrario, el tratamiento con formol fija los flagelos y se obtiene suspensiones de bacterias flageladas, que, aunque también contienen el antígeno O, por producirse la aglutinación con el antígeno H más rápidamente y a título más elevado, se comportan como

suspensiones flageladas puras. La aglutinación flagelar es rápida, en forma de grumos grandes, blandos y algodonosos, que rápidamente se deshacen por agitación (Poppof, 2001).

Con respecto al antígeno flagelar, las salmonellas pueden ser monofásicas, cuando contienen siempre el mismo antígeno flagelar, generalmente específico (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A), o difásicas, cuando el antígeno flagelar puede presentarse alternativamente en fase específica (fase 1) característica del serotipo, o en fase menos específica (fase 2) que puede ser común con otras especies de salmonella. Cuando se aísla una salmonella en fase 2, generalmente es necesario proceder a una inversión de fase para reconocer el antígeno flagelar específico y llegar a la identificación del serotipo (Poppof, 2001).

c) Antígeno Vi

Es un antígeno capsular termolábil, que presentan algunas especies recién aisladas (*Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* C, *Salmonella dublín*), responsable de la O-inaglutinabilidad. Por la adición de un nuevo suero Vi se produce una aglutinación lenta y granular más fina que la O (aglutinación Vi). Por tratamiento con calor se destruye el antígeno Vi y la suspensión se hace aglutinable por un suero O. El antígeno Vi, junto con el O, es el responsable de la virulencia, y los anticuerpos Vi presentan poder protector (Poppof, 2001).

2. 2. 3. 2. Toxinas.

Contienen una endotoxina común a las enterobacterias, y en las salmonelas aisladas de gastroenteritis se han descrito enterotoxinas que podrían ser la causa de la diarrea líquida que se presenta. En ese sentido, salmonela presentaría propiedades enteroinvasivas y quizás enterotóxicas. Una endotoxina asociada con la porción A del lipopolisacárido (LPS) de la célula bacteriana, la cual cuando es lisada, puede ser responsable del cuadro febril y ocasionar lesiones a nivel del hígado y el bazo. Los lipopolisacáridos (LPS)

contribuye a la resistencia bacteriana ante el ataque y digestión por los fagocitos del huésped (Poppof, 2001).

2. 3. TIPIFICACIÓN

Principalmente se determina por fagotipificación y por serotipificación. La metodología de fagotipificación es la misma en todo el mundo, ya que utiliza los mismos bacteriófagos y es ampliamente usada para la clasificación de aislamientos de salmonella que pertenece a serotipos comunes. La utilización de la fagotipificación, para propósitos epidemiológicos se basa en asumir que los aislamientos que pertenecen al mismo fagotipo tiene relación epidemiológica entre si, mientras que aislamientos de diferente fagotipo carecen de esa relación; además, los serotipos deben demostrar una alta estabilidad dentro de la población y con el paso del tiempo (Mancera *et al.*, 2004).

Los estudios epidemiológicos de esta infección en todo el mundo han determinado la clasificación de los diferentes aislamientos de salmonella en fagotipos (FT), tomando en consideración ciertas características como su virulencia y patogenicidad. El fagotipo no guarda ninguna correlación con la antigenicidad, debido a que está mediado por plásmidos. Además, la diferenciación epidemiológica de las cepas patógenas dentro de un serotipo es frecuente seguida por la clasificación de una bacteria determinada en base a la presencia de receptores bacterianos específicos en la superficie de la pared celular, los cuales permiten que un virus bacteriófago específico se fije a la bacteria, penetre y multiplique dentro de ella destruyéndola (Lozano, 2001).

Por otra parte, el serotipo de un aislamiento en particular de salmonella está determinado por la combinación de los antígenos O y H que exprese. La serotipificación de los aislamientos generalmente se complementa con bacterias de antisueros específicos. Las pruebas de aglutinación en placa se usan primero para determinar el antígeno somático y luego el antígeno flagelar determinándose mediante pruebas de aglutinación en tubo (Gast, 2003).

2. 4. EPIDEMIOLOGÍA

El género salmonella está ampliamente distribuido en el mundo encontrándose como parte natural o patógeno si encuentra las condiciones favorables en el tracto gastrointestinal de humanos, mamíferos domésticos y salvajes, reptiles, aves y roedores, pudiendo causar en el hombre y los animales un amplio espectro de enfermedades como enterocolitis o septicemias con compromiso de otros órganos tales como las meninges, el oído, los pulmones, los riñones y el hueso (Aguilar y Escolástica, 2004).

Las fuentes más comunes de transmisión de ésta bacteria son los alimentos contaminados de origen animal y vegetal, animales enfermos que a través de sus heces pueden contaminar suelos y aguas, materiales y utensilios, Otras fuentes de infección son los portadores subclínicos y clínicos que comprenden desde animales domésticos y humanos (Aguilar y Escolástica, 2004).

Desde el punto de vista epidemiológico las salmonellas se pueden clasificar en tres grupos: 1) las que no tienen preferencias por algún huésped, pues la mayoría de serotipos son huéspedes naturales de los animales y pueden infectar al hombre, 2) las que infectan sólo al hombre: *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A y *Salmonella paratyphi* C, y 3) las que están adaptadas a un hospedero en especies animales como *Salmonella abortus ovis*, (bovinos-ovinos), *Salmonella abortus equi* (equinos) y *Salmonella gallinarum* (aves) (Aguilar y Escolástica, 2004) .

En los animales podrían presentarse infecciones específicas en determinadas especies, como *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis* serotipos ubicuos que producen epidemias en poblaciones de ratas, *Salmonella abortus equi* y *ovis*, que son la causa de aborto infeccioso de las yeguas y ovejas, respectivamente; *Salmonella typhi suis*, que causa el tifus en lechones, *Salmonella cholerae- suis* que produce una infección grave en porcinos, *Salmonella gallinarum*, que provoca la tifosis aviar, *Salmonella pullorum*, que ocasiona la diarrea blanca de los pollos, *Salmonella anatum* y *Salmonella*

newington, que producen la enfermedad de la quilla en los patos, etc. Pero, además, la mayoría de salmonellas pueden producir infecciones inespecíficas en gran número de animales, que manifiestan en general problemas gastrointestinales (Aguilar y Escolástica, 2004).

Estas bacterias son capaces de sobrevivir en gran variedad de condiciones de estrés por largos períodos de tiempo, pueden resistir la deshidratación, sobrevivir en el suelo y en el agua (Aguilar y Escolástica, 2004). Estos microorganismos pueden estar presentes en heces, pienso, carne cruda y vísceras, y en materiales de origen vegetal. La fuente de contaminación ambiental son las heces. Las salmonellas pueden sobrevivir en suelos húmedos y sombríos hasta nueve meses (Cartel *et al.*, 1979).

Cualquiera de los serotipos de salmonella, posiblemente, en respuesta a las condiciones de estrés sufre cambios en la expresión de sus genes, pudiendo además ocurrir recombinaciones homólogas que resulten en reacomodos de fragmento de ADN causando la formación de duplicaciones, deleciones, transposiciones e inversiones, que producen nuevos tipos en salmonellas más resistentes y por ende más virulentas (Briones *et al.*, 2004).

El reservorio esta constituido por animales enfermos o portadores, especialmente mamíferos y aves, así como también animales de abasto (ovinos, bovinos, porcinos), y domésticos (perros, gatos, tortugas). Los alimentos más importantes son la carne de pollo, pavo, pato, cerdos y bovinos; le siguen la leche huevos y crustáceos, y en menor cantidad pescados y vegetales. Es decir, la mayoría de los vertebrados pueden ser infectados por *Salmonella spp.* Sin embargo. La susceptibilidad del huésped y el desarrollo del estado de portador varía con la ubicación geográfica y el tipo de alimento consumido (Briones *et al.*, 2004).

La contaminación de la carne puede ocurrir durante la vida del animal o después de su sacrificio. La contaminación *in vivo* puede presentarse como consecuencia de un caso clínico o asintomático. La presencia de salmonella se

inicia en las granjas por la introducción de animales enfermos o portadores, o por el consumo creciente de piensos compuestos y contaminados, que contienen harinas de origen animal (carne, pescado, huesos). La salmonella se expande a grupos de animales en unidades de cría o engorde que facilitan la contaminación por contacto directo o indirecto a través del medio ambiente y, posteriormente por las condiciones de transporte, estabulación, hacinamiento y temperatura elevada (Aguilar y Escolástica, 2004).

La contaminación en el camal se produce durante el sacrificio del animal, y a partir del contenido intestinal o del medio ambiente, mediante utensilios, aguas residuales y presencia de roedores, que facilitan la contaminación de otras carcasas. Los productos más contaminados son los alimentos manipulados como las carnes preparadas (carnes picadas, salchichas), los productos de pastelería y helados en los que pueden intervenir diversos ingredientes contaminados desde el origen (huevos o leche en polvo, coco rallado, cacao) como consecuencia de su mezcla y manipulación (Aguilar y Escolástica, 2004).

A pesar de la contaminación de salmonellas en alimentos, el número de casos es menor del que se espera, porque la dosis infectiva debe ser muy elevada y varía de 10^6 hasta 10^9 , según la virulencia de la cepa. Por ello, en la mayoría de casos es necesario un período de multiplicación en el alimento antes de su consumo para alcanzar la dosis infectiva, lo que ocurre cuando se mantiene el alimento durante cierto tiempo a temperatura ambiente o en condiciones de escasa refrigeración. La preparación de alimentos constituyen un factor limitante de la contaminación, que puede ser sobrepasado por los hábitos alimentarios, sobre todo cuando existe la costumbre del consumo de carne cruda o poco cocida (Gast, 2003).

Además, el alimento puede contaminarse una vez preparado, a partir de los alimentos crudos, lo cual ocurre cuando estos se manipulan con las manos y utensilios, pues las bacterias desarrollan rápidamente en alimentos preparados. Es el gran problema de la contaminación cruzada por alimentos, que se produce en las cocinas particulares, restaurantes, supermercados y

sobretudo en las grandes empresas especializadas en el suministro colectivo de alimentos y comidas preparadas (Gast, 2003).

En el Perú no se han reportado casos de *Salmonella spp* en tortugas por lo cual es necesario realizar un estudio para demostrar la presencia de *Salmonella spp* y la identificación del serotipo en las tortugas motelo criadas en cautiverio dado que las condiciones de medio ambiente se ven favorables para su detección.

2. 5. PATOGÉNESIS

Aunque muchos aspectos de la patogénesis de las salmonelosis permanecen sin explicación, particularmente la relación entre las toxinas de las salmonellas y el daño celular que producen, algunas características generales asociadas con la virulencia son conocidas.

La virulencia de las salmonellas se relaciona con su capacidad de invadir células hospedadoras, replicarse en su interior y resistir tanto la digestión por fagocitos como la destrucción por la acción del sistema de complemento. Mientras que su patogenicidad esta relacionada a la expresión de sus antígenos, toxinas y daño que producen en el individuo susceptible (Holt y Porter, 1992). La bacteria ingresa vía oral con los alimentos contaminados supera la barrera gástrica incluido el medio ácido del estomago llegando al íleon terminal y/o colon limitándose a la mucosa intestinal cuando se trata de salmonellas enterocolíticas produciendo una inflamación local, la salmonella realiza su ingreso a la célula hospedera por adhesión usando ciertas adhesinas, como los flagelos peritricos componente del antígeno H que favorecen el ondulamiento de la membrana celular intestinal, para luego realizar una internalización forzada a la célula epitelial a nivel de las células M sobre las placas de peyer del íleon por medio de una serie de elementos que presenta la bacteria como las islas de patogenicidad uno (SPI-1) que activa a un sistema secretor especializado tipo tres (SST-3) que se encuentra en la membrana externa de la bacteria, éste sistema a su vez inyecta proteínas

efectoras(PE) en el citosol de la célula hospedera, las más importantes PE son: SipA, SipB, SipC, SipD y SipE. que tienen la función de reensamblar factores de funcionamiento de señales de transducción que interfieren con las vías de señalización de la célula hospedera produciendo una reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera induciendo la ondulación que favorece el ingreso de mas bacterias, facilitando así una estrategia patogénica de colonización de bacterias (Holt y Porter ,1992)

2. 5. 1. MECANISMOS DE ADHERENCIA

La supervivencia de un microorganismo depende de su habilidad para adherirse, las adhesinas de la bacteria tienen una estructura que les permite reconocer moléculas presentes en las células del hospedero llamadas receptores, con una estereoquímica específica. Esta unión determina los hospederos y el organotropismo de las bacterias; además, las adhesinas tienen la capacidad de activar a los linfocitos B y neutrófilos, lo que resulta en una variedad de respuestas biológicas incluyendo proliferación celular y secreción de citocinas (Edwards y Puente, 1998).

En las bacterias, se puede encontrar amplia variedad de adhesinas, las cuales se dividen en dos grupos: adhesinas fimbriales y adhesinas afimbriales, como la hemaglutinina filamentosa de *Bordetella pertussis* y el antígeno pH6 de *Yersinia pestis*, AfaD, AfaE en *E. coli* y proteína M de *Streptococcus*. En general, las adhesinas de bacterias gram negativas son: fimbria, fibrilla, flagelo, lipopolisacárido (LPS) y cápsula. La presencia de cápsula y flagelo en salmonella depende de la especie, solamente *Salmonella enterica* serovar *typhi*, *Salmonella enterica* serovar *paratyphi* C y *Salmonella enterica* serovar *dublin* presentan cápsula y todas las salmonellas se consideran móviles a excepción de *Salmonella enterica* serovar *gallinarum*.

Es común el aislamiento de una bacteria que exprese múltiples tipos de fimbria, salmonella expresa una variedad de fimbrias con diferente especificidad de unión (Cuadro 5) (Figuroa y Verdugo, 2005).

CUADRO 5 .

Fimbrias que se han reportado en *Salmonella*

Fimbria	Serovares	Dimensión	Adhesina	Subunidad mayor	Masa molecular (kD a)	Receptor
Tipo1(Sef21)	Varios	8mm	FimH	Fim	21	Manosa, fibronectina laminina
Tipo2	<i>S. gallinarum</i> ^d <i>S. pullorum</i> ^e	8mm	Ausente			
Tipo3	<i>S. typhimurium</i> y otras?		MrkD-like	?		Colágeno tipo V
SEF17	Varios	4mm	AgfA ^a		17	Fibronectina
SEF14	Grupo D y otras?	Delgado	SefA	SEF	14	?
SEF18	Todos	2mm	Sef D	SEF	18	?
Pef ^b adherencia a enterocitos	<i>S. entérica serovar Typhimurium</i>		PefA		15	?
LPF ^c adherencia a células M	<i>S. typhimurium</i> <i>S. gallinarum</i> ^d		LpfE			manosa
BDF (bunde-forming plus) no ha podido ser confirmado <i>in vivo</i>						

^aAgfA (thin agregative fimbria)^bPef (fimbria encoded plasmid) adherencia a enterocitos^cLPF (long polar fimbria)^d*Salmonella enterica serovar gallinarum*^e*Salmonella enterica serovar pullorum*

Fuente: (Edwards y Puente, 1998).

Después de la entrada al hospedero, un patógeno bacteriano puede adherirse tanto directamente a la superficie de la célula hospedera o a la matriz extracelular, cuando el tejido está dañado la matriz extracelular subyacente es expuesta. (Edwards y Puente, 1998).

Tras producirse la adhesión a la superficie de las células de la mucosa intestinal, a través de fijación mediante fimbrias, producen la ondulación de las membranas celulares (Le Minor *et al.*, 1982). Estas favorecen el ingreso de las bacterias en vesículas formadas por la propia membrana, que se multiplican desde las vesículas pudiendo ser eliminados de las células, que sufren un daño ligero o transitorio.

El complejo proceso de invasión es mediado por los productos de la expresión de varios genes cromosómicos, mientras que la capacidad de crecer en el interior de las células hospedadoras depende de la presencia de plásmidos.

La resistencia a la digestión por fagocitos y la acción del complemento facilita la difusión de las salmonellas por el organismo del hospedador. Los efectos tóxicos oxidativos de los radicales libres producidos por los fagocitos son minimizados por las actividades de las enzimas: catalasa y superóxido dismutasa.

La resistencia a la acción del sistema de complemento depende en parte de la longitud de las cadenas lipopolisacárido del antígeno O (LPS), ya que las cadenas largas previenen el ataque de los componentes del complemento sobre la membrana celular (Le Minor *et al.*, 1982). El LPS es responsable también de los efectos endotóxicos de las salmonelosis, contribuyendo a la respuesta inflamatoria local que daña las células del epitelio intestinal y da lugar a la aparición de la diarrea. El LPS de la pared también interviene en el shock endotóxico que acompaña a la salmonelosis septicémica.

La interacción de un patógeno con una célula hospedera usualmente provoca la activación de caminos de señalización de la célula hospedera, ya sea de manera directa por componentes bacterianos o por estimulación de factores activadores del hospedero, como las citocinas inflamatorias. Tales activaciones pueden alterar la superficie de la célula hospedera, proveyendo así al patógeno con receptores de adhesinas alternos. Los receptores de las células del hospedero son reconocidos por las adhesinas de la salmonella que determina la especificidad del tejido y colonización o persistencia bacteriana (Le Minor *et al.*, 1982).

2. 5. 2. MECANISMO DE INFECCIÓN

Después de la ingestión de agua o material contaminado, la salmonella inicia su ciclo de infección invadiendo al hospedero a través del tejido linfoide, incluyendo las placas de peyer y tonsilas cecales. Se adhiere apicalmente a las células epiteliales del íleon y a las células M que debido a la ausencia del borde de cepillo así como de glicocalix, representan una puerta de entrada ideal para las enterobacterias (Galán y Sansonetti, 1996; Jensen *et al.*, 1998; Jepson y Clark, 1998).

Muchos microorganismos patógenos son capaces de entrar y sobrevivir dentro de las células. Salmonella dirige su arribo a células hospederas que no son normalmente fagocíticas como la superficie de la capa mucosa de células epiteliales. Presumiblemente, ésta técnica de invasión asegura un nicho celular protegido para que el microbio se replique o persista.

Salmonella invade las células del hospedero por un mecanismo conocido como disparo (*trigger*). La bacteria envía señales a las células epiteliales que inducen rearrreglos del citoesqueleto dando lugar a la formación de ondulamiento (*ruffling*) en su superficie, como respuesta al contacto. Se reconocen varias proteínas efectoras (PE) de las islas de patogenicidad (Las islas de patogenicidad se constituyen por un grupo de genes encargados de

codificar factores específicos de virulencia) involucradas en los rearrreglos del citoesqueleto: SipA, SopB, SopE y SopE2 (Galán y Curtiss III, 1991).

- . SipA es una proteína de unión a actina, que inhibe la despolimerización de F-actina y activa T-plasmina (SipE en *Salmonella enterica* serovar *typhi*) (Galán y Colmer, 1999).
- . SopB (*Salmonella outer protein*), como se conoce para *Salmonella enterica* serovar Dublin, o SigD (*Salmonella* invasión genes) para *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, por su actividad de inositol fosfato fosfatasa, también reorganiza el citoesqueleto de actina (Galán y Curtiss III, 1991)
- . SopE se comporta como factor de intercambio de Guanina (GEF) en las proteínas induciendo al ondulamiento de la membrana, que permite la internación de salmonella además estimula a la quinasa reguladora por señales extracelulares (Erk), quinasa terminal (JNK) y a las proteínas activadas por mitogen-cinasas (Galán y Curtiss III, 1991).
- . La proteína SopE2 muestra un 69% de homología con la secuencia de Sope, activa a CDC42, la cual activa al complejo que inicia la polimerización de actina y ramifica filamentos de actina (Galán y Colmer, 1999).

La salmonella una vez colonizado el intestino delgado la bacteria debe resistir el medio ácido del estómago penetrando a las células epiteliales, migrando a la lámina propia de las uniones cecal e ileocecal, finalmente, multiplicarse en los folículos de la región linfóide, presentando hiperplasia e hipertrofia reticuloendotelial. Los polimorfonucleares son estimulados y la infección se limita. En el caso de los serotipos productores de fiebre entérica, éstos no son retenidos a este nivel sino que migran al hígado y al bazo por circulación hemática. La respuesta inflamatoria induce la liberación de prostaglandinas, estimula la producción de AMP cíclico y la secreción activa de

líquidos, produciendo diarrea en el caso específico de la enteritis (Sánchez *et al.*, 2002).

La salmonella establece un estrecho contacto con el borde del cepillo del epitelio intestinal. Antes del contacto inicial, el borde permanece intacto. Sin embargo, cuando la bacteria se acerca a la superficie epitelial, las microvellosidades circundantes empiezan a degenerarse con elongación, edema y crecimiento en un proceso llamado “rizado”. Aquí, los efectores interactúan con las proteínas de la célula hospedera para reordenar el citoesqueleto de actina e inducir cambios morfológicos que causan estas células, normalmente no fagocíticas, la bacteria se internaliza en un proceso llamado invasión. También ocurre cuando salmonella está dentro de una vacuola ligada a la membrana tanto en células epiteliales como macrófagos (Sánchez *et al.*, 2002).

Aunque la mayoría de los organismos son eliminados de los tejidos por los mecanismos de defensa del hospedador, la forma subclínica puede persistir dando lugar a la eliminación de pequeñas cantidades de salmonellas por las heces. También podrían presentarse infecciones latentes en la vesícula biliar y la enfermedad clínica puede desarrollarse a partir de cuadros subclínicos y latentes si los individuos portadores se ven sometidos a condiciones que provoquen un aumento del número de salmonellas (Gitter *et al.*, 1978).

2. 6. INMUNIDAD

En los animales y humanos la inmunidad alude a la capacidad general de un huésped de resistir a una determinada infección o enfermedad producida por agentes patógenos y que además agrupa la actividad de varios órganos y tipos de células que interactúan en diversas formas para desencadenar la respuesta inmunológica, que ejerce una respuesta a la presencia de sustancias extrañas (antígenos) y como resultado del estímulo se produce proteínas específicas que se llaman anticuerpos o inmunoglobulinas que constituyen la inmunidad

humoral y células específicas llamadas células T activadas comprendidas en la inmunidad celular (Monzón *et al.*, 1995).

La respuesta inmune celular constituye una parte crítica de la defensa del huésped contra la agresión de ciertas bacterias intracelulares, así como salmonella (intracelular) .Por lo tanto la inmunidad protectora optima contra estas bacterias requiere usualmente de la combinación de diferentes elementos del sistema inmunitario para orquestar una respuesta segura de protección. Para ser mas preciso, la resistencia a los patógenos bacterianos facultativos intracelulares depende de la inmunidad celular mediada por células y de la activación de macrófagos por parte de los linfocitos T. Uno de los mecanismos mas críticos, responsable de la protección es la activación de macrófagos por parte del interferón gamma (IFN- γ), sin embargo, la efectiva protección contra los agentes infecciosos intracelulares redunda en la activación de linfocitos T capaces de producir las citocinas adecuadas (Infante *et al.*, 2002).

El sistema de linfocitos T esta constituido por sub poblaciones estables de acuerdo al uso que le dan a su receptor, el cual esta conformado por un conjunto de moléculas que interactúan con los productos de los genes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de las células infectadas y el perfil de citosina correspondiente. Seguidamente describiremos el rol de la célula TCD4+ y TCD8+ en la regulación de la infección. La inmunidad contra las bacterias intracelulares fue considerada exclusivamente mediada por las células T CD4+. Recientemente, la óptima protección contra bacterias intracelulares debe verse como una acción coordinada entre las diferentes subpoblaciones linfocitarias T. Por otra parte, estudios recientes postulan que la célula T CD8+ citotóxica juega un papel central en la defensa contra infecciones bacterianas intracelulares. Sin embargo, el mecanismo mediante el cual la célula TCD8+ coordina esta situación de resistencia debe ser dilucidado. El mismo podría estar relacionado con la combinación de diferentes funciones del T CD8+ tales como la producción de IFN- γ , su actividad citotóxica y su actividad reguladora de las citocina tipo 2, pudiendo ser todo esto, determinante en el control de la infección (Infante *et al.*, 2002).

La contribución de las respuestas humores y celulares para otorgar protección inmune a las tortugas frente a salmonella es algo incierto. Los mecanismos responsables no han sido definidos claramente (Gast, 2003).

La respuesta inmune tiene la capacidad de minimizar el tiempo de la enfermedad o infección, la severidad y generar protección contra la reinfección. Esta respuesta es la que también nos permite realizar la detección serológica. Se han realizado grandes esfuerzos por hallar la forma de eliminar a la *Salmonella enteritidis* en las diferentes especies de animales y de hallar el rol que cumplen los diferentes componentes de la respuesta inmune en la protección contra la infección por *Salmonella enteritidis*. La respuesta inmune celular resulta en protección contra retos posteriores y en la eliminación del organismo del cuerpo del huésped (Holt y Porter, 1992).

2. 7. SIGNOS CLÍNICOS

Los típicos signos de la infección, incluyen depresión progresiva, anorexia, y de algún caso de presentación de diarrea lo que eventualmente produce una deshidratación (Okamura *et al.*, 2001).

En la mayoría de las especies animales se presentan tanto la forma septicemia como la enterocolítica de la enfermedad. Las salmonellas pueden afectar a la mayoría de los animales domésticos y salvajes, aunque las infecciones por salmonellas en reptiles están asociadas con enfermedad sólo en animales jóvenes e inmunosuprimidos (Gitter *et al.*, 1978).

Los cuadros de salmonelosis pueden afectar a individuos de cualquier edad, la incidencia es mucho más alta en individuos jóvenes y ancianos que son más susceptibles a sufrir complicaciones (Wilkins y Roberts, 1988), (Benenson, 1992).

En los animales podría manifestarse infección en su forma clínica; En la forma subclínica, el animal podría tener una infección latente y albergar el

patógeno en los ganglios, o puede ser portador eliminándose el agente por las materias fecales, en forma transitoria, intermitente o persistente. Además las heces diarreicas pueden contener sangre con moco y restos desprendidos de epitelio intestinal produciendo pérdida de peso (Timoney *et al.*, 1988; Cooper, 1994).

2. 8. DIAGNÓSTICO Y AISLAMIENTO

El diagnóstico depende del aislamiento e identificación del agente causal (Stender *et al.*, 2000).

Las cepas que son consideradas como salmonella deben ser enviadas a un centro de referencia de salmonella para su identificación definitiva (Finlay y Cossart, 1997).

2. 8. 1. DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO Y SEROLÓGICO

Se efectúa por aislamiento e identificación de la bacteria causal en la muestra de sangre, heces, orina, órganos y tejidos o por la demostración de anticuerpos en el suero mediante reacciones de aglutinación (Finlay y Cossart, 1997).

2. 8. 1. 1. Métodos de aislamiento.

La bacteria causal se aísla fundamentalmente de la sangre durante la fase de bacteriemia, pero también de las heces, orina y con menor frecuencia de otras localizaciones (Finlay y Cossart. 1997).

a) Hemocultivo.

Es el método de elección. La siembra de 5 a 10 ml de sangre obtenidos durante el período febril en un frasco de hemocultivo permite conseguir un 90 a 100% de resultados positivos durante la primera semana de la enfermedad,

proporción que disminuye en las semanas siguientes. Se puede aislar también a partir del coágulo de una muestra de sangre remitida para serología, sembrándola en un medio de enriquecimiento (Bilis-Tetratiónato, Selenito F); no exige precauciones especiales y se consigue un elevado porcentaje de resultados positivos, al eliminar el poder bactericida del suero (Galán y Curtiss III, 1991).

b) Coprocultivo.

Las bacterias se eliminan por las heces a partir de la segunda semana persistiendo durante toda la enfermedad. Característica importante como uso de diagnóstico teniendo como base un cuadro clínico compatible. Determinándose el período de eliminación del microorganismo de un individuo diagnosticado y curado clínicamente (Galán y Collmer, 1999).

Se siembran las heces directamente en medio de enriquecimiento y selectivos (Medio Salmonella-Shigella) o (Wilson Blair). Las muestras de heces se procesan en 4 fases:

1. Medio líquido de pre-enriquecimiento no selectivo es usado para estimular su desarrollo. Esto no es recomendado cuando existe grandes números de organismos competitivos que podrían crecer mucho más que la salmonella en este medio. Este es el caso de las muestras de contenido intestinal y heces para lo que se recomienda un medio selectivo de enriquecimiento.
2. Medio líquido de enriquecimiento selectivo líquido permite la expansión del desarrollo de salmonella mientras que inhibe el crecimiento de otros microorganismos. Los caldos selectivos usados frecuentemente son: Rappaport-Vasiliadis (RV), Tetratiónato Muller Kauffman (TT), caldo Selenito/Cistina (SC). El Tetratiónato ha demostrado ser más efectivo que los caldos RV y SC en algunos tipos de muestras, como hisopados cloacales tejidos intestinales, pool del contenido de huevos y alimento

para aves. Rappaport-Vassiliadis han demostrado ser efectivo en muestras de aves crudas y pools de contenidos de huevos. El caldo selenito/cistina es menos usado por el riesgo de toxicidad para el personal de laboratorio.

3. Siembra en placas y selección de las colonias características. La siembra en agares que permiten el desarrollo de colonias incluso a partir de una sola célula bacteriana. Algunos agares no selectivos son usados para la siembra directa a partir del hisopado de órganos internos. Para esta fase se emplea Agar Verde brillante Rojo fenol. La selección del segundo medio se deja a discreción de los laboratorios y pueden ser Agar Salmonella-Shiguelia(SS), agar XLD (Xylose lisien deoxychlate agar), agar XLT4, Agar Bismuto sulfito y Agar Hektoen enteric (HE) (Gast ,1997). Las salmonellas producen colonias similares a la *Escherichia coli* (colonias lisas, circulares, convexas, con bordes bien diferenciados), pero no fermentadoras de lactosa.
4. Prueba confirmatoria. Finalmente, las colonias son compatibles con *Salmonella spp.* Son sometidas a pruebas bioquímicas y serológicas para confirmar el género y el serotipo. Para la diferenciación bioquímica se basa en la fermentación de carbohidratos y actividad de los aminoácidos descarboxilasas y otras enzimas. Algunas pruebas, como por ejemplo la producción de indol a partir de triptófano, se emplean como sistema de identificación rápida (Brooks *et al.* ,1999).

Se pueden encontrar en el mercado numerosos tipos de sueros aglutinantes que contengan anticuerpos contra uno o más factores antígenos O (Fu y Galán, 1999).

c) Otros métodos.

También se pueden aislar a partir de la tercera semana y de otros órganos, sembrando agar sangre y Mac Conkey, EMB (Gast, 1997).

La identificación se efectúa por pruebas bioquímicas y análisis antigénico. Las colonias lactosas negativas se siembran en medio de Kligler y las cepas que no producen gas (lactosa negativo, glucosa positivo, gas negativo y SH₂ positivo) se ensayan con sueros polivalentes y monovalentes para la identificación de los antígenos O, H y Vi, que para *Salmonella typhi* son O (9,12), H (d, -) y Vi. En caso negativo se debe repetir la aglutinación con la suspensión calentada para destruir el antígeno Vi. Si persiste la negatividad y se comprueba por reacciones bioquímicas que es una salmonella, se debe proceder directamente a la identificación del serotipo (Gast, 2003).

2. 8. 1. 2. Pruebas Serológicas

La base de la serotipificación de *Salmonella enterica* es poner en evidencia la presencia de antígenos somáticos de superficie (LPS, antígenos O), antígenos flagelares (proteínas, antígenos H) y capsulares. La detección serológica con anticuerpos específicos es usada como método screening preeliminar para detectar poblaciones con experiencia previa a salmonella. Las pruebas serológicas confirmativas se realizan por aglutinación sobre portaobjetos con sueros apropiados a partir de colonias puras y después de la eliminación de cepas autoaglutinantes, esta prueba emplea antisueros comerciales frente a los antígenos O y H pudiendo encontrar numerosos tipos de sueros aglutinantes que contengan anticuerpos contra uno o más factores antigénicos H o también O propio de cada especie de salmonella (Gast, 2003).

Esta prueba se basan en demostrar anticuerpos a título significativo en el suero del individuo enfermo a partir de la primera semana de la enfermedad, por medio de reacciones de aglutinación cuantitativas frente a los antígenos O y H de los principales serotipos (Gast, 2003).

Para la interpretación correcta de los resultados hay que tener en cuenta: a) que en la población normal se pueden encontrar anticuerpos residuales, como consecuencia de infecciones anteriores que obligan a considerar como significativos sólo los títulos superiores a los valores medios de la población, y

b) que en el curso de la infección, la cinética de los anticuerpos frente a los diversos antígenos es diversa.

Los anticuerpos aparecen precozmente (6 a 8 días), alcanzan títulos moderados y desaparecen rápidamente a los 3 a 6 meses. Los anticuerpos, por el contrario, aparecen más tarde (de 8 a 12 días), alcanzan títulos más elevados y persisten durante más tiempo, pueden demostrarse títulos bajos durante más de un año. Los anticuerpos Vi aparecen más tardíamente (tercera semana) y alcanzan títulos bajos (1/10 a 1/20) (Gast, 2003).

2. 9. PREVENCIÓN Y CONTROL

Prevenir el consumo de alimentos contaminados o que están en mal estado de preparación ya sea de origen animal o vegetal con el microorganismo, del mismo modo evitar el contacto directo con las heces que provengan de animales con salmonelosis usados como mascotas (perro, reptiles y todo tipo de animal exótico) o como animales de abasto (Joshua y Feltham, 2005).

Prevenir la contaminación de materiales y utensilios con animales que excretan salmonella; También se debe tener precaución con el suelo del recinto del animal, por las continuas descargas fecales.

Es necesario la detección de portadores subclínicos y clínicos en humanos y animales, para reducir la prevalencia de salmonella en ambas especies.

La prevención del contacto hacia el excremento del reptil u otro animal debe dirigirse a la colocación de guantes y limpieza del recinto del reptil manteniendo su ambiente limpio y no permitiendo el contacto directo del animal con la preparación de alimentos para el consumo humano. Así como también no permitir el manejo de reptiles a niños menores de 5 años (Joshua y Feltham, 2005).

2.10. SALUD PÚBLICA

Las salmonellas causantes de enfermedades infecciosas considerada como enfermedad endémica continúa siendo un problema en medicina veterinaria y humana, por ocasionar grandes pérdidas económicas convirtiéndose así en un importante problema de salud animal y pública (Wray, 1993). La salmonelosis puede dividirse en dos síndromes: “La fiebre enterica” (causada por *Salmonella typhi*) y a la “Fiebre Paratifoidea” (causada por *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B o *Salmonella paratyphi* C); y la gastroenteritis o intoxicaciones por alimentos que es una infección restringida a la mucosa intestinal, causada por muchos serotipos, siendo los más comunes *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*, siendo los más patógenos para humanos como para animales. Es común que la salmonelosis se presente tanto en casos esporádicos como en brotes, que afectan a una o más personas.

Las salmonellas de origen animal causan en el hombre una infección intestinal que se caracteriza por un período de incubación de 6 a 72 horas, y es considerada una enfermedad con mayor demanda de atención hospitalaria en muchos países (Wilkins y Roberts, 1988). Los síntomas de salmonelosis varían desde dolor abdominal suave, náuseas o calambres, a signos como diarrea, vómito y fiebre.

El hombre puede contraer la salmonella en forma directa de animales domésticos o de animales que se mantienen en la casa, tales como mascotas (perros, tortugas, monos y otros). Los niños pequeños son especialmente susceptibles a las salmonellas de reptiles, aun sin tener contacto directo (Centers for Disease Control and Prevention. 1992b.). La implicancia en salud pública afecta a la mayoría de personas que consumen agua y alimento contaminado o que están en mal estado de preparación, sin mencionar el riesgo ocupacional de las personas que tienen contacto con ésta bacteria (Centers for Disease Control and Prevention. 1992b.)

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3. 1. Lugar de estudio

El estudio se realizó en un zoocriadero particular ubicado en el caserío Cruz del Sur, Km 8 de la carretera Iquitos – Nauta; a una altitud de 104 m.s.n.m., 4° 30' 11" Latitud Sur y 73° 34' 24 Longitud Oeste, Provincia de Maynas, Región Loreto.

3. 2. Animales

El zoocriadero consta de 30 tortugas motelos (*Geochelone denticulata*), criadas en un área cercada de 25 m² aproximadamente, construido con materiales de la misma zona y piso de tierra; con alimentación a base de frutas y verduras y agua *Ad libitum*. Algunas tortugas aparentemente normales presentaron historia de evacuaciones frecuentes de diarrea de aspecto verdoso, fétidas, mucoides y en ocasiones con estrías de sangre.

Fig. 1: Tortugas Motelos (*Geochelone denticulata*) animales que se trabajaron en el estudio



3. 3. Tamaño de muestra

Se evaluó el total de la población del zoocriadero, 30 tortugas motelos (*Geochelone denticulata*), para hallar la frecuencia de *Salmonella spp* en el total de animales.

3. 4. Muestras

Se tomaron muestras de heces de tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) por medio de hisopado rectal estéril y llevadas al Laboratorio de la Estación Experimental IVITA_Iquitos donde se colocaran en un medio de enriquecimiento (Agar Tripticasa de Soya) y fueron enviadas en condiciones de

refrigeración (4 – 6 °C), utilizando cajas aislantes con refrigerante a la sección de Bacteriología y Micología del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria – Universidad Nacional Mayor de San Marcos, para su procesamiento.

Fig. 2: Recolección de muestras de tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) mediante hisopado rectal y colocación en el medio de transporte T.S.I.



Fig. 3: Muestras de hisopados rectales de tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) en medio T.S.I



3. 5. Procesamiento de las muestras

Las muestras fueron analizadas utilizando la técnica de Cultivo e Identificación bacteriana para *Salmonella spp.* Según el protocolo de Aislamiento e Identificación bacteriana para *Salmonella spp.* y otras bacterias de la sección de Bacteriología y Micología del laboratorio de Microbiología y Parasitología basado en el método descrito por la FDA en el Manual Analítico Bacteriológico (1995).

Se utilizaron caldos de enriquecimiento como el Caldo Rappaport, Caldo Tetraciónato y Caldo Selenito, y placas de agar Salmonella Shigella (SS), agar Verde Brillante (VB) y agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD). Las bacterias fueron identificadas por sus características metabólicas mediante pruebas bioquímicas utilizando los siguientes medios: Medio SIM, Agar TSI (Hierro Tres azúcares), Agar Citrato de Simonns, Agar Lisina, Caldo Urea, además del reactivo de Kovacs para la determinación de la producción de Indol. Además, se realizó la identificación con antiseros polivalentes (DIFCO Salmonella H Antiserum a-z). Para la determinación del serotipo, las cepas aisladas fueron

enviadas para su biotipificación al Instituto Nacional de Salud, utilizando el método: Who Global Salm Surv (2007).

3. 5.1. Procedimiento:

1. Las muestras fueron colocadas en caldo de enriquecimiento Trypticase de soya a temperatura ambiente durante 30 minutos
2. Se suspendió una alícuota de esta muestra enriquecida en los caldos Tetrationato, Rappaport y Selenito, estos tubos fueron colocados en Estufa a 42 °C durante 24 horas.
3. Transcurridas las 24 horas se sembraron los caldos enriquecidos en los agares SS, XLD y VB, y se incubaron en estufa a 37 °C por 24 horas en condiciones de aerobiosis.
4. Luego de transcurridas 24 horas, se observó las placas para verificar si hubo o no crecimiento, y se anotarán las características de las colonias bacterianas presentes, se consideró sospechosa de salmonella las colonias que presenten una coloración negra en las placas de SS y XLD debido a la producción de H₂S, característica típica de los géneros *Salmonella spp*, *Citrobacter spp* y *Proteus sp*
5. Se realizó una tinción gram a cada una de las colonias y se observó al microscopio con objetivo de 100x y aceite de inmersión, para determinar morfología bacteriana.
6. Luego de determinarse la morfología bacteriana se realizaron las pruebas bioquímicas para la diferenciación de la *salmonella spp* de los géneros bacterianos con similares características de crecimiento.
7. Se observaron las características de: Utilización del Citrato, descarboxilación de Lisina, Producción de H₂S, movilidad, fermentación de glucosa, sacarosa, lactosa, hidrólisis de la urea, producción de indol y producción de gas. Además de la producción de H₂S en agar SS y XLD, y crecimiento de colonias rojas en Agar Verde Brillante.
8. Las bacterias que cumplieron con los siguientes requerimientos fueron consideradas como especies de salmonella: (Cuadro 6).

CUADRO 6. Descripción de Características Metabólicas de Especies de
Salmonella spp

Característica metabólicas	Fermentación			Producción de gas	Producción de H ₂ S	Movilidad	Indol	Citrato	Lisina	Urea	Crecimiento de colonias negras en SS	Crecimiento de colonias negras rodeadas de un halo rosado en agar XLD	Crecimiento de colonias rojas en agar VB
	Glucosa	Lactosa	Sacarosa										
RESULTADO	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+

Fuente: Koneman *et al.*, 1992

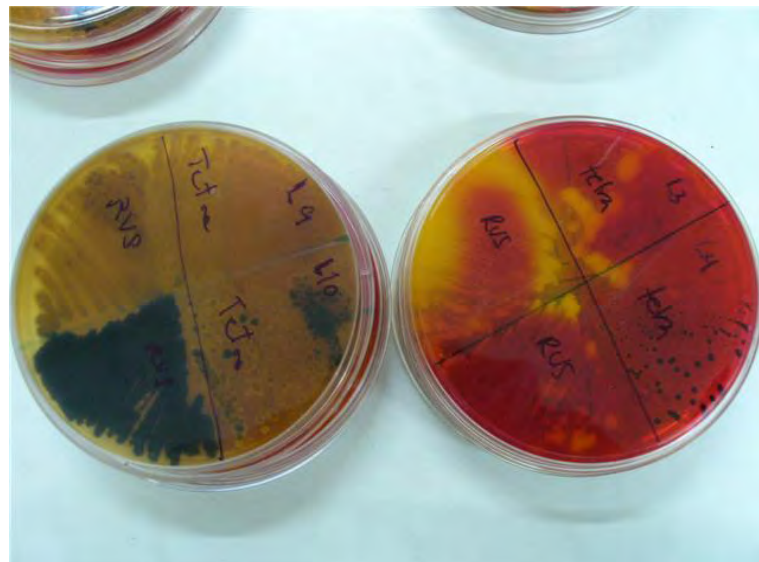
9. A las colonias bacterianas que resultaron positivas a salmonella mediante la identificación bioquímica se les realizó la prueba de aglutinación simple con antisuero polivalente (DIFCO Salmonella H a-z) para confirmar que realmente eran positivas.
10. Se consideró una muestra positiva a salmonella en las cuales se haya aislado el microorganismo e identificado como tal mediante pruebas bioquímicas y aglutinación con antisueros.

Fig. 4: Colonia compatible a *Salmonella spp.* en agar XLD



Característica macroscópica: colonias redondas de tamaño pequeño, de bordes redondeados y la parte central de color negro

Fig. 5: Colonias compatibles a *Salmonella spp.* en agar SS y XLD



AGAR SS

AGAR XLD

Fig. 6: Observación de las características metabólicas mediante pruebas bioquímicas de la bacteria *Salmonella spp.*



Muestras de hisopado rectal de tortugas motelo

Fig.7: Prueba serológica (aglutinación simple con antisuero Polivalente DIFCO Salmonella H Antiserum a-z)



Aglutinación

IV. RESULTADOS

Se aisló 2 muestras positivas a *salmonella spp.* de las 30 tortugas que es el total de la población (Cuadro 7).

Las dos muestras positivas a *Salmonella spp.* pertenecieron a dos animales aparentemente enfermos; en ambos casos se identificó por tipificación *Salmonella enterica subespecie enterica serotipo typhimurium* (Cuadro 8).

CUADRO 7. Proporción de muestras positivas y porcentaje a 6 especies de bacterias en el total de la población diagnosticadas mediante pruebas bioquímicas

BACTERIA	MUESTRA																														% EN EL TOTAL DE MUESTRAS
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9	L10	
<i>Salmonella spp.</i>							+																	+							6.7 (2/30)
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+		+		+		+	+	+	+	+		+	+	+	+	+		+	+		+	+	+	+	+	+	80.0 (24/30)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+				+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	80.0 (24/30)
<i>Proteus vulgaris</i>						+				+		+	+			+		+	+											+	26.6 (8/30)
<i>Proteus mirabilis</i>														+						+											6.7 (2/30)
<i>Citrobacter spp.</i>													+			+	+		+									+			16.7 (5/30)

CUADRO 8. Tipificación de muestras positivas a *Salmonella spp* realizada en el Instituto Nacional de Salud (I.N.S.)

MUESTRA	DIAGNOSTICO BACTERIOLÓGICO	TIPIFICACIÓN
7	<i>Salmonella spp.</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
L4	<i>Salmonella spp</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>

Fuente: Instituto Nacional de Salud (I.N.S.)

(VER ANEXO: 1)

V. DISCUSIÓN

El presente estudio constituye la primera contribución científica que permite detectar la presencia de *Salmonella spp.* como parte de la flora normal del tracto digestivo de tortugas motelo (*Geochelone denticulata*) en nuestro medio, teniendo en cuenta la crianza en cautiverio.

Casos de salmonelosis humana asociada a reptiles han sido reportados desde la década de 1940 en los Estados Unidos, posteriormente se determinó que las tortugas criadas como mascotas fueron responsables de 280 000 casos en promedio de salmonelosis por año en dicho país hasta fines de la década de 1970 (Bradley *et al.*, 2001). En el Perú según reportes estadísticos del Instituto Nacional de Salud, el número de casos en personas confirmados por bioquímica y serología con *Salmonella spp.*, se ha incrementado de 87 casos a 159, durante el período de 1991 al 2001; siendo los serotipos más comunes *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium*, seguido por *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A, *Salmonella paratyphi* B. Sin embargo hay que considerar que el número de serotipos y casos puede ser mayor, puesto que no todos los centros de salud envían el total de su cepas aisladas al Laboratorio de Enteropatógenos del Centro Referencial del Instituto Nacional de Salud (Aguilar y Escolastica, 2004). Además, en los últimos años, se ha incrementado la crianza de animales exóticos como mascotas (serpientes, iguanas, tortugas, etc.), incrementando el riesgo de contraer una enfermedad zoonótica (Amstutz *et al.*, 2000).

Los reptiles exóticos han incrementado su popularidad como mascotas durante los últimos años; este incremento ha permitido el mayor número de infecciones de salmonella asociadas a reptiles, especialmente en infantes y en personas inmunodeprimidas. Los reptiles son considerados no solo como reservorios de salmonella por estar en la flora normal intestinal si no como una posible causa de infección enterocolítica o septicemia si se presenta favorablemente las condiciones; además, una amplia variedad de serovares han sido aislados por lo que podrían ser considerados como una fuente potencial de infección zoonóticas (Lax *et al.*, 1995; Bauwens *et al.*, 2006); Sin embargo, la proporción en la detección de salmonella es variable, dependiendo de la especie animal estudiada y de las características externas que lo rodea (Monzón *et al.*, 1995).

El estudio evidenció que la presencia de *Salmonella spp.* es 6.67 % (2/30), en tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*) criadas en cautiverio, siendo menor de lo esperado en comparación a otros estudios similares, donde poblaciones de tortugas terrestres evidenciaron un porcentaje de positividad superior al 10% Corsalini (1975). Asimismo Pasmans *et al.* (2000) aisló salmonella en un 79% de muestras fecales de tortugas terrestres (*Testudo graeca* y *Testudo hermani*). No obstante, los estudios de prevalencia de salmonella realizados en tortugas de agua son relativamente bajos (Bäumler *et al.*, 1998); Además, Geue y Loschner. (2002) determinó un bajo porcentaje de salmonella en tortugas en comparación con lagartos y serpientes.

Sin embargo, bajo las condiciones de este estudio, los hisopados cloacales probablemente no son la mejor muestra representativa para determinar la prevalencia de salmonella, especialmente cuando hay poco o ninguna muestra fecal (Monzón *et al.*, 1995).

Según Hidalgo –Vila *et al.* (2007) la ingestión de heces o aguas contaminadas podrían causar infección por salmonella. En nuestro estudio, la fuente de contaminación de los animales examinados no ha sido determinada, considerando que *Salmonella spp.* podría ser fácilmente transmitida por

contacto fecal y que los animales evaluados permanecieron bajo las mismas condiciones de manejo y en un mismo ambiente. Según Shane *et al.* (1990), son encontradas en la vía digestiva de la mayor parte de los animales, incluyendo reptiles, cuyo ingreso puede ser por vía fecal-oral.

El más importante serotipo de salmonella involucrada en salmonelosis en humanos es *Salmonella enterica subespecie enterica serotipo enteritidis* (Pasmans *et al.*, 2000), el cual encuentra similitud con éste estudio con la diferencia que en nuestro trabajo el aislamiento hallado fue *Salmonella enterica subespecie entérica serotipo typhimurium*, que provoca un cuadro de enterocolitis y otras manifestaciones como náuseas, cefaleas y vómitos (Brooks *et al.*, 1999). Este hallazgo difiere de los reportados por Bäumler *et al.* (1998) donde la presencia de *Salmonella enterica* subespecie II y IIIb está generalmente asociado a poiquilótermos. Además, Pasmans *et al.* (2000) reportó *Salmonella enterica* con predominancia de la subespecie I, en un centro de conservación de quelonios en Toscana, Italia. Otros estudios, como los de Greenberg y Sechter (1992) en Israel, y los de Doutre y Boche (1976) en Senegal, manifestaron serotipos distintos hallados en tortugas lo cual apoya la idea de estar asociada a la región geográfica y a la especie de tortuga estudiada.

Es importante señalar que *Salmonella spp.* está presente en diferentes especies de animales domésticos. Así como lo reporta Quinn *et al.*, 2004 que indica que los serotipos del *Salmonella typhimurium* posee un rango de hospedadores comparativamente amplio y que los serotipos de esta bacteria se distribuyen por todo el mundo e infectan numerosos mamíferos, aves y reptiles y se excretan principalmente por las heces.

El presente estudio contrasta también con lo reportado por Corsalini (1975) y Shane *et al.* (1990) los cuales mencionan que en una misma muestra es posible encontrar más de un serotipo de salmonella al mismo tiempo.

Finalmente, Abalem de Sá *et al.* (2001) reportó que *Escherichia coli* representa la principal enterobacteria en muestras de heces de tortugas terrestres de vida libre, seguido de *Enterobacter*, *Pseudomonas sp*, *Shigella sp*, *Salmonella spp*, *Proteus spp* y otras poblaciones microbianas en menor proporción. Nuestros resultados encontraron similitud, porque *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* se hallaron en un 80% (24/30), *Proteus vulgaris* en un 26.6% (8/30), *Citrobacter spp.* en 16.7% (5/30) y tanto *Salmonella spp* y *Proteus mirabilis* en 6.7 % (2/30). Por tal motivo los datos obtenidos en éste estudio realizado pueden servir como base para futuras investigaciones en el aporte de la detección de salmonella y otras enterobacterias en tortugas Motelo (*Geochelone denticulata*).

VI. CONCLUSIONES

6. 1. *Salmonella enterica* está presente en tortugas motelo (*Geochelone denticulata*) criadas en un zoocriadero en cautiverio en un porcentaje de 6.7 %.

6. 2. A la biotipificación se encontró *Salmonella enterica subespecie enterica* seritipo *typhimurium* en las dos muestras positivas a *Salmonella spp.*

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. **Aguilar, F. ; L. Escolastica. 2004.** Caracterizacion Fenotipica y Genotipica de Estirpes de *Salmonella choleraesuis* Aisladas de Ambientes Marinos. http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/Tesis/Basic/flores_al/Intro.pdf.
2. **Amstutz, H.; D. Anderson; S. Armour; L. Jeffcott; F. Loew; A.Wolf. 2000.** EL MANUAL MERCK DE VETERINARIA. Océano Grupo Editorial,S.A. España. Quinta Edicion. 225-226.
3. **Bäumler, A.; R. Tsolis; T. Fitch; I. Adams. 1998.** Minireview: evolution of host adaptation in *Salmonella entérica*. Infection and immunity 66: 4579-4587.
4. **Bauwens, L.; F. Vercammen; S. Bertrand; J. Collard; S. De Ceuster. 2006.** Journal of Applied Microbiology. 101: 284 – 289.
5. **Benenson, A. 1992.** EL control de las enfermedades transmisibles en el hombre 15^{va}. ed. Informe Oficial de la Asociación Estadounidense de Salud Pública. Washington, D.C. Organización Panamericana de la Salud (Publicación Científica 538).
6. **Bergey, D.; F. Harrison; R. Breed; B. Hammer; F. Huntoon. 1987.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins: 136.
7. **Bradley, T.; F. Angulo; M. Mitchell. 2001.** Public Veterinary Medicine: Public health education on *Salmonella spp* and reptiles. J. Am. Vet. Med. Assoc. Vol 219. N^o 6: 745 - 755.

8. **Brenner, F.; R. Villar; F. Angulo; R.Tauxe. 2000.** Swamiathan B. Guest commentary. *Salmonella* nomenclature. J Clin Microbiol. 2465 - 2467
9. **Briones, V.; S. Téllez; J. Goyache; C. Ballesteros; M. Lanzarot; L. Domínguez; J. Fernandez – Garayzábal. 2004.** *Salmonella* diversity associated with wild reptiles and amphibians in Spain. Environmental microbiology. 6 (8): 868 – 871.
10. **Brooks, G.; S. Morse; J. Butel. 1999.** Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Editorial El Manual Moderno. Mexico. 277-281.
11. **Cartel, M.; H. Dewes; O. Griffiths, 1979.** Salmonellosis in foals. Journals of Equine Medicine and Surgery, 3: 78-83
12. **Centers for Disease Control and Prevention, (CDC) 1992b.** Iguana-associated salmonellosis-indiana, 1990. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 41(3): 38-39.
13. **Cooper, G. 1994.** Salmonellosis-infections in man and chicken: patogénesis and the development of live vaccines- a review. Veterinary Bulletin, 64: 123-143.
14. **Corrente, M.; A. Madio; K. Friedrich ; G. Greco ; C. Desario ; S. Tagliabue ; M. Incau ; M. Campolo ; C. Buonavoglia. 2004.** Isolation of *Salmonella* strains from reptile faeces and comparison of difference culture media. Journal of Applied Microbiology. 96: 709 – 715.
15. **Corsalini, T. 1975.** Ricerche sulla frequenza delle *salmonelle* nelle tartarughe Della provincia di Foggia (*Testudo hermanni*). Atti della Societa Italiana della Scienze Veterinarie 29: 624-627.
16. **Doutre, M. ; R. Boche. 1976.** Portage de *Salmonella* chez *Testudo sulfata* tortue terrestre du Senegal. Revue d' Elevage et de Medicine Veterinaire des Pays Tropicaux 29 : 313-316
17. **Edwards, R.; J. Puente. 1998.** Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestine al pathogenesis. Trends. Microbiol. 6:282-287.
18. **Ewing, W. 1986 .**Identification of Enterobacteriaceae. 4th. ed. Elsevier
19. **Figueroa, M.; A. Verdugo. 2005.** Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella spp.* Revista Latinoamericana de Microbiología Vol. 47, No. 1-2 January - March. 2005 April - June. 2005. 25 – 42.

20. **Finlay, B.; P. Cossart. 1997.** Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science*. 276:718-725.
21. **Fu, Y.; J. Galán. 1999.** A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and CDC42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. 401:293-297.
22. **Freeman, B. 1989.** Microbiología de Burrows. Internacional/ McGraw-Hill. 22ª edición. 526-532. Mexico.
23. **Galán, J. 1996.** Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. *Mol. Microbiol.* 20:263-271.
24. **Galán, J.; R. Curtiss III. 1991.** Distribution of the *invA*, *-B*, *-C* and *-D* genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. *Infect. Immun.* 59:2901-2908.
25. **Galán, J.; P. Sansonetti. 1996.** Molecular and cellular bases of *Salmonella* and *Shigella* interactions with host cells. In Neidhardt F.C.*et. al.* eds. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. ASM Press. 2757-2799.
26. **Galán, J.; A. Collmer. 1999.** Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*. 284:1322-1328.
27. **Gast, R. 1997.** Paratyphoid infections. *Diseases of Poultry*. 10ma Ed. 97-129.
28. **Gast, R. 2003.** Paratyphoid infections. *Diseases of Poultry*. 11ª Ed. 583-599. SAIF
29. **Geue, L.; U. Loschner. 2002.** *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Veterinary Microbiology*. 84: 79 – 91.
30. **Gitter, F.; M. Wray; C. Richardson; R. Pepper. 1978.** Chronic *Salmonella Dublin* infection of calves. *British Veterinary Journal*, 134, 113-121.
31. **Greenberg, Z.; I. Sechter. 1992.** *Salmonella* seroty isolated from snakes and other reptiles-Israel, 1953-1989. *Israel Journal of Veterinary Medicine* 47:49-60

32. **Heinen, J. 2005.** Parasitic Infections in Tortoises. Russia.
www.russiantortoise.org/parasitic_infections_in_tortoise.htm. (consultada 09/11/2006)
33. **Hidalgo – Vila J.; C. Díaz – Paniagua; C. de Frutos – Escobar; C. Jiménez – Martínez; N. Pérez – Santigosa. 2007.** *Salmonella* in free living terrestrial and aquatic turtles. *Veterinary Microbiology*. 119: 311 – 315.
34. **Holt, P.; R. Porter Jr. 1992.** Microbiological and Histopathological Effects of an Induced-Molt Fasting Procedure on a *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Avian Dis.* 36: 610-618.
35. **Infante, D.; C. de Noguera; A. Leon; A. Herrera. 2002.** Infecciones por *Salmonellas Paratífoides* en Aves FONAIAP Divulga N°68: 19-21. Venezuela.
36. **Jensen, V.; J. Harty; B. Jones. 1998.** Interactions of the invasive pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* and *Shigella flexneri* with M cells and murine Peyer's patches. *Infect. Immun.* 66:3758-3766.
37. **Jepson, M.; M. Clark. 1998.** Studying M cell and their role in infection. *Trend. Microbiol.* 6:359-365.
38. **Joshua, V.; B. Feltham. 2005.** Reptiles and *Salmonella*.
<http://www.reptilia.org/Education/Habitarium/Salmonella%20and%20Reptiles.pdf>
39. **Koneman, E.; S. Allen; W. Janda; P. Schreckenberger; W. Winn. 1992.** *Diagnostic Microbiology*. Fourth Edition. Philadelphia. 136.
40. **Lax, A.; P. Barrow; P. Jones; T. Wallis. 1995.** Current perspectives in salmonellosis. *British Veterinary Journal*, 151: 351-377.
41. **Le Minor L.; M. Popoff. 1987.** Request for an opinion. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov. nom. rev. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol.* 37: 465 – 468.
42. **Le Minor, L.; M. Veron; M. Popoff. 1982.** Taxonomia de *Salmonella*. *Am. Microbiol. (L. Pasteur)* 133B 223.
43. **Lozano, F. 2001.** *Salmonella spp.* Serotipificación y Fagotipificación Mitos y Realidades. Venezuela Avícola. On line

44. **Mancera, A.; J. Vasquez. 2004.** Assad Heneidi Zeckua. Fagotipificación de aislamientos de *Salmonella enteritidis* obtenidos de aves en México. Tec pecu Mex. 42 (2): 287-294.
45. **Monzón, C.; M. Ojeda; A. Echeita; M. Usera. 1995.** Occurrence of *Salmonella* in cold – blooded animals in Gran Canaria, Canari Islands, Spain. *Antonie van Leeuwenhoek* 68: 191 – 194.
46. **Okamura, M.; Y. Kamijima; T. Miyamoto; H. Tani; K. Sasai; E. Baba. 2001.** Differences Among Six *Salmonella* serovars in Abilities to Colonize Reproductive Organs and to Contaminate eggs in Laying Hens. *Avian Dis.* 45: 61-69.
47. **Pasmans, F.; P. De Herdt ; F. Haesebrouck. 2002.** Presence of *Salmonella* infection in freshwater turtles. *The Veterinary Record.* 150: 692 -693.
48. **Pasmans, F.; P. De Herdt ; M. Chasseur – Libotte; D. Ballasina; F. Haesebrouck. 2000.** Occurrence of *Salmonella* in tortoises in a rescue centre in Italy. *The Veterinary Record.* 146: 256 – 258.
49. **Pasmans, F.; F. Van Immerseel; W. Van den Broeck; E. Bottreau; P. Velge; R. Ducatelle; F. Haesebrouck. 2003.** Interactions of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Muenchen with Intestinal Explants of the Turtle *Trachemys scripta scripta*. *J. Comp. Path.* Vol. 128, 119 – 126.
50. **Popoff, M. 2001.** Antigenic Formulas of the *Salmonella* Serovars. WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur. 8 va edicion. Paris Francia. 5 .
51. **Popoff, M. ; L. Le Minor. 2001.** Formules antigeniques des serovars des *Salmonella*. WHO collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. Institut Pasteur, Paris.
52. **Quinn, P. ; B. Markey; M. Cartel; W. Donnelly; F. Leonard. 2004.** Microbiología y enfermedades infecciosas veterinarias. Editorial Acibia, S. A. España. 134-137.
53. **Reeves, M.; G. Evins; A. Heiba ; B. Plikaytis ; J. Farmer. 1989.** 3rd. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonella* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and

- proposal of *Salmonella bongori* .com.nov. J Clin Microbiol. 27(2): 313 – 320.
54. **Sanchez, S.; C. Hofacre; M. Lee; J. Maurer ; M. Doyle. 2002.** Animal sources of Salmonellosis in Humans. Vet. Med. Today: Zoonosis Update. JAVMA. Vol 221. Nº 4: 492 – 497.
 55. **Silvino, Z. 1996.** Dificultades Especiales en el Mantenimiento en Cautividad de animals Salvajes en América del Sur. Revista Científica Tecnológica del Instituto de Epizootias. 15: 267 – 287.
 56. **Shane, S.; Gilbert, R; K. Harrington. 1990.** *Salmonella* colonization in comercial pet turtles. Epidemiology Infection 105: 307-316.
 57. **Stender, S.; A. Friebe; S. Linder; M. Robde ; S. Miold ; W. Hard. 2000.** Identification of SopE2 from *S. typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdo42 of the host cell. Mol. Microbiol. 36: 1206-21.
 58. **Strohl, P.; B. Tilly; S. Fremy; A. Brisabois; V. Guerin – Faublée. 2004.** the veterinary Record. 154: 56 – 58.
 59. **Takayuki, E.; K. Yoshiaki ; Y. Eiko. 2000.** Internacional Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.
<http://ijs.sgmjournals.org/cgi/reprint/50/2/945.pdf>.
 60. **Timoney, J.; J. Gillespie; F. Scott; J. Barlough. 1988.** *Hagan and Bruner's* Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. 8 th ed. Ithaca, New York: Comstock.
 61. **Wilkins, E.; C. 1988.** Roberts. Extraintestinal. Salmonellosis. Epidemiol Infect 100: 361-368
 62. **Who Global Salm Surv. 2007.** Manual de Procedimientos Diagnóstico y caracterización de *Salmonella* spp.
<http://www.panalimentos.org/salmsurv/file/manuales/Manual%20Salmonella%201-02-07.pdf>
 63. **Wray, C.; I. McLaren; P. Carrol. 1993.** *Escherichia coli* isolated from farm animals in England and Wales Between 1986 and1991. Veterinary Record, 133: 420-439.

VII. APÉNDICE

ANEXO 1.



MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD
CENTRO NACIONAL DE SALUD PUBLICA
LABORATORIO DE ENTEROPATOGENOS

INFORME DE RESULTADOS

Establecimiento: UNIV MAYOR DE SAN MARCOS

Referencia: OF.Nº0460-CEUPS-FMV-06

Dr.(a): SONIA CALLE ESPINOZA

UNIV.MAYOR DE SAN MARCOS

Fecha Toma Muestra : 01/09/2006

Fecha Recep. LAB : 08/09/2006

Fecha Recepción INS : 07/09/2006

CONTROL DE CALIDAD Y TIPIFICACION

Fecha de Emisión : 22/09/2006

Código Lab.Origen	Código INS	Código LANARE	Resultado Laboratorio de Origen	Resultado
L4	09-42592-06	1.475-06	Salmonella sp	Salmonella Typhimurium
7	09-42593-06	1.476-2006	Salmonella sp.	Salmonella Typhimurium

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD

Bios. MAGDA EIROGA SÁNCHEZ JARA
Directora General de Entendimiento y Atención al Ciudadano
Centro Nacional de Salud Pública